

3. Material e Métodos

3. Material e Métodos

Os erros hereditários da via de biossíntese do colesterol caracterizam-se por uma diminuição da biossíntese endógena de colesterol, com acumulação dos respectivos precursores esteróis e estão na origem de algumas síndromes polimalformativas. O exemplo mais usual é a síndrome Smith-Lemli-Opitz (SLO) (défice na enzima 3 β -hidroxiesterol Δ^7 -reductase (DHCR7)), no entanto, a Desmosterolose (défice na enzima 3 β -hidroxiesterol Δ^{24} -reductase) e a Latosterolose (défice na enzima 3 β -hidroxiesterol Δ^5 -desaturase) são outras das síndromas polimalformativas da biossíntese de colesterol.

Têm sido descritos na literatura vários métodos aplicáveis à quantificação de esteróis, incluindo: (1) a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), (2) a cromatografia gás-líquido (GLC), (3) a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) e (4) a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS). Entre eles, o mais comum é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), sendo considerada uma das mais sensíveis e específicas técnicas analíticas, para a análise de esteróis biológicos (Ahmida *et al.*, 2006).

Nesta secção irão ser descritas duas técnicas analíticas de cromatografia que permitem a quantificação de diversos esteróis em amostras biológicas: o HPLC e o GC-MS

3.1. Material, Equipamento e Reagentes

3.1.1. Material

- ✓ Adaptadores de pequeno volume, “insert” de vidro;
- ✓ Balões de vidro de 10 e 100mL;
- ✓ Cápsulas de alumínio com septo de teflon;
- ✓ Dispensador (pipeta automática) e pontas adequadas de 25, 10, 5 e 1mL;
- ✓ Gobelés;
- ✓ Filtros *millipore*[®] de 4mm (0,45 μ m) (*Millex*[®]-LH, ref. SLLHR04NL);
- ✓ Micropipetas de 100, 200 μ l e 1000 μ l;
- ✓ Pipeta de 5ml;
- ✓ Pipetas de vidro;
- ✓ Tetinas;

- ✓ Seringas de 2ml com agulhas;
- ✓ Suportes para tubos e vials;
- ✓ Tubos de vidro de 10ml com rolha para extracção de lípidos;
- ✓ Tubos de vidro de 10ml de fundo cónico;
- ✓ “Vials” de vidro de 2mL (frascos para a introdução da amostra no injector automático).

3.1.2. Equipamento

- ✓ Agitador automático (*Multi Tube Vortexer*, modelo VX-2500);
- ✓ Balança (*Mettler Toledo*, modelo XS205);
- ✓ Banho de água (*Memmert*, modelo WNB 7-45);
- ✓ Capsulador electrónico (*Agilent Technologies*, ref. 5183-4763);
- ✓ Centrífuga (*Heraeus Instruments*, Labofuge 400e);
- ✓ Coluna de HPLC *Lichrospher*[®] RP-18, 250/4 cm, 5µm;
- ✓ Coluna de GC-MS *Equity*TM-1, *Supelco*, 15m x 0,1 mm x 0,1 µm (coluna capilar de sílica);
- ✓ Cromatografia de fase gasosa com detector de espectrometria de massa, GC-MS (*QP 2010 Plus*, *Shimadzu*) e computador com software de controlo (*Labsolutions – GCMS solutions*, *Shimadzu*);
- ✓ Descapsulador electrónico (*Agilent Technologies*, ref. 5184-3567);
- ✓ Detector “diode-array” (DAD) (*Hitachi*, modelo L-7455);
- ✓ Estufa (*Heraeus Instruments D-6450 Hanau*, modelo T6060);
- ✓ Evaporador com fluxo de azoto (*Techne*, modelo FSC 4000);
- ✓ Excicador;
- ✓ Hotte;
- ✓ Aparelho HPLC (*Lachrom*, *Merck Hitashi*) e computador com software de controlo (*HSM-system 1*);
- ✓ Injector automático de GC-MS (*AOC-20i*, *Shimadzu*);
- ✓ Sistema de filtragem da fase móvel (*E.M.G.*, modelo 63/2);
- ✓ Vortex (*Heidolph*, modelo Deax 2000).

3.1.3. Reagentes e soluções

- ✓ Azoto (grau de pureza 99.999%);
- ✓ Bis(trimetil-silil)trifluoroacetamina (BSTFA) (Sigma, ref. T-5634): fornecido em caixas de 10 ampolas de 1mL;
- ✓ Etanol absoluto (*Panreac*, ref. 121086.1212): fornecido em frascos de 2.5L;
- ✓ Etanol a 96%: mediram-se 4mL de H₂O destilada e adicionaram-se 96mL de etanol absoluto, de modo a fazer um volume final de 100mL;
- ✓ Hélio (grau de pureza 99.999%);
- ✓ KOH (*Merck*, ref. 6498): fornecido em pastilhas, em frasco de 1kg;
- ✓ Solução 0.6M de KOH em etanol a 90%: pesaram-se 3.37g de KOH e dissolveram-se em 10mL de H₂O destilada, sob agitação. Adicionou-se lentamente e em volumes reduzidos etanol a 90% até se perfazer o volume final de 100mL;
- ✓ n-Hexano pro-análise (*Merck*, ref. 1.04367.1000): fornecido em frascos de 1L;
- ✓ Metanol para HPLC (*VWR*, ref.0502679): fornecido em frascos de 2.5L;
- ✓ H₂O destilada;
- ✓ H₂O para HPLC (*VWR*, ref. 0604270): fornecida em frascos de 2.5L;
- ✓ 7-dehidrocolesterol (*Sigma*, ref. D-4429): fornecido em frascos de 1g e armazenado a 0°C;
 - Solução de 7-dehidrocolesterol 1mM: adicionaram-se 19.23mg de 7-dehidrocolesterol a um volume de 50mL de etanol a 96% e deixou-se a agitar lentamente até dissolver. O frasco com a solução foi envolvido em prata e bem rolhado. Armazenar a - 20°C;
- ✓ Colesterol (*Sigma*, ref. C-8667): fornecido em frascos de 1g e armazenado a 0°C;
 - Solução de Colesterol 1mM: adicionaram-se 19.33mg de colesterol a um volume de 50mL de etanol a 96% e deixou-se a agitar lentamente até dissolver. Armazenar a - 20°C;
- ✓ Colestanol (Dihidrocolesterol) (*Sigma*, ref. D-6128): fornecido em frascos de 10g e armazenado à temperatura ambiente;
 - Solução de Colestanol 1mM: adicionaram-se 38.9mg de colestanol a um volume de 100mL de etanol a 90% e deixou-se a agitar lentamente até dissolver. Armazenar a - 20°C;
- ✓ Epicoprostanol, padrão interno (Pi) (*Sigma*, ref. C-2882): fornecido em frascos de 10g

- e armazenado à temperatura ambiente;
- Solução de Epicoprostanol 0.16mM: adicionaram-se 6.31mg de epicoprostanol a um volume de 100mL de etanol a 96% e deixou-se a agitar lentamente até dissolver. Conservar a solução até um ano e armazenar a -20°C;
 - ✓ Desmosterol (*Sigma*, ref. D-6513): fornecido em frascos de 10mg e armazenado a -20°C;
 - Solução de Desmosterol 1mM: adicionaram-se 19.23mg de desmosterol a um volume de 50mL de etanol a 96% e deixou-se a agitar lentamente até dissolver. Armazenar a -20°C;
 - ✓ Latosterol (*Sigma*, ref. C-3652): fornecido em frascos de 25mg e armazenado a -20°C;
 - Solução de Latosterol 1mM: adicionaram-se 19.33mg de latosterol a um volume de 50mL de etanol a 96% e deixou-se a agitar lentamente até dissolver. Armazenar a -20°C;
 - ✓ Lanosterol (*Sigma*, ref. L-5768): fornecido em frascos de 5mg e armazenado a -20°C;
 - Solução de Lanosterol 1mM: adicionaram-se 21.34mg de lanosterol a um volume de 50mL de etanol a 96% e deixou-se a agitar lentamente até dissolver. Armazenar a -20°C;
 - ✓ β -Sitosterol (*Sigma*, ref. S-1270): fornecido em frascos de 10mg e armazenado a -20°C;
 - Solução de β -Sitosterol 1mM: adicionaram-se 20.73mg de β -sitosterol a um volume de 50mL de etanol a 96% e deixou-se a agitar lentamente até dissolver. Armazenar a -20°C;
 - ✓ Fase móvel 100:4 de metanol/H₂O (filtrada e desgaseificada);
 - ✓ Piridina pro-análise (*Merck*, ref. 1.04367.1000): fornecido em frascos de 1L.

3.2. Amostras

As amostras biológicas analisadas neste estudo foram líquidos amnióticos (LA) com diferentes semanas de gestação, os quais estavam congelados a -20°C, até serem processados. Foram utilizadas 330 amostras de LA de fetos sem patologia, que foram agrupadas em função do número de semanas de gestação, desde a 13ª semana até à 22ª semana, havendo ainda um grupo heterogéneo formado por LA com mais de 22 semanas de gestação (> 22 semanas de gestação). Para além dos LA de fetos sem patologia, foi também

analisada uma amostra LA de uma gestação de um feto com suspeita de síndrome Smith-Lemli-Opitz.

Como controlo de qualidade interno (CQI), foi utilizada uma “pool” de LA de fetos normais, com 16 semanas de gestação, onde foi adicionada em cada ensaio, uma sobrecarga de uma mistura padrão de esteróis (7-deidrocolesterol, desmosterol, latosterol e β -sitosterol) de concentração 10 μ M. A “pool” foi dividida em alíquotas de 2.5ml, que foram congeladas a -20°C.

3.3. Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para a análise de esteróis.

3.3.1. Introdução à metodologia de HPLC

O HPLC é uma técnica cromatográfica qualitativa e quantitativa que permite a separação de diferentes componentes de uma amostra e a sua posterior detecção e quantificação. O princípio da metodologia consiste na dissolução da amostra num solvente (fase móvel), o qual é forçado a migrar, por acção de variadas pressões, numa fase estacionária, imobilizada numa coluna, onde ocorre a separação dos diferentes componentes da amostra. À medida que a amostra é arrastada pela fase móvel ao longo da coluna, cada componente migra, de acordo com as interacções não-covalentes existentes entre si e com as das fases móvel e estacionária. As diferentes interacções determinam o grau de migração e de separação dos componentes contidos na amostra. A eluição na coluna pode ser feita com um único solvente, ou com uma mistura de solventes (Wilson and Walker, 1999).

Conforme as polaridades das fases móvel e estacionária, a cromatografia líquida pode classificar-se em cromatografia de fase normal (fase móvel apolar e fase estacionária polar) ou cromatografia de fase reversa (fase móvel polar e fase estacionária apolar). O tipo a utilizar depende dos analitos a separar, sendo a mais utilizada, a cromatografia de fase reversa, que permite obter boas separações e é menos sensível a impurezas polares que possam existir no eluente (como por exemplo, a água) (Wilson and Walker, 1999).

A cromatografia de fase reversa baseia-se no princípio das interacções hidrofóbicas, que resultam de forças repulsivas entre um solvente relativamente polar, um analito relativamente apolar e uma fase estacionária apolar, o que por consequência provoca tempos de retenção mais longos para as moléculas de natureza apolar. Verifica-se também que o

tempo de retenção aumenta com a adição de um solvente polar à fase móvel e diminuiu pela adição de um solvente mais hidrofóbico. Nestas condições, os compostos polares permanecem na fase móvel, sendo eluídos antes dos compostos não polares, que têm maior afinidade para a fase estacionária. Este tipo de cromatografia é extremamente sensível à composição da fase móvel, sendo as fases móveis mais utilizadas: água, metanol, etanol, isopropanol e acetonitrilo. A escolha dos solventes, aditivos e gradientes depende da natureza da fase estacionária e do analito (Wilson and Walker, 1999).

Os principais aspectos a considerar na utilização do HPLC são o tipo de coluna, o eluente, o sistema de eluição (isocrático ou gradiente), a temperatura, a pressão, o volume de injeção e o tempo de corrida. Quanto ao manuseamento do equipamento, existem vários cuidados a ter nomeadamente: com a pressão máxima de trabalho (depende das colunas), trabalhar com reagentes de pureza adequada, a inexistência de bolhas de ar no sistema e as corrosões que vão ocorrendo nas partes metálicas com o tempo.

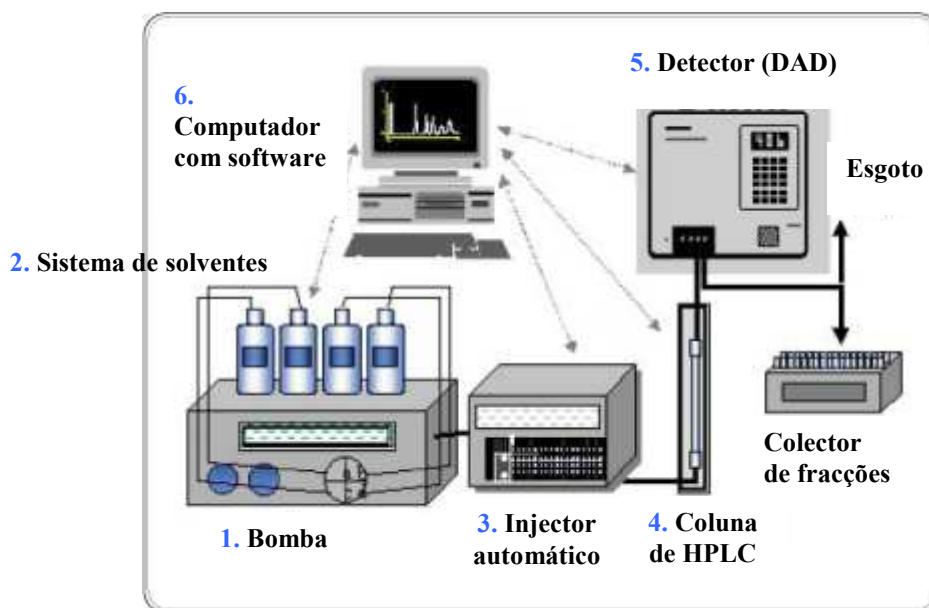


Figura 3.1. Componentes base de um aparelho HPLC. (Reproduzido e adaptado de <http://www.forumsci.co.il:80/HPLC/html>. Acesso em 10/07/2007).

Legenda da figura: **1.** A bomba é responsável pela deslocação da fase móvel e está acoplada a sistemas que permitem o controlo do fluxo e da composição da fase móvel (**2.**). A composição da fase móvel pode ser fixa (eluição isocrática) ou variável, ao longo do tempo, mediante programação prévia, ou seja, a composição do eluente varia (eluição por gradiente). **3.** O injetor é composto por uma micro-seringa que injecta a amostra directamente para o sistema ou para um “loop”, de volume variável (que depende do fabricante e da aplicação). Se se recorrer ao uso do “loop”, após o enchimento deste, efectua-se uma rotação no sistema, de modo a fechar a válvula da injeção e abrir outra válvula que permita a transferência da amostra para o tubo onde flui a fase móvel em direcção à coluna. **4.** A coluna de aço inox pode estar acoplada a um forno para controlo da temperatura. A fase estacionária encontra-se ligada quimicamente ao suporte, normalmente de sílica gel. Esta ligação é conseguida através de reacções de siliciação. O tamanho dos poros da fase estacionária (apolar), define uma característica da coluna e a capacidade das moléculas do analito em penetrar para o interior da partícula e interagir com a sua superfície interna e, desta forma, retê-las (apolares) ou não (polares). **5.** Após a separação na coluna, os vários componentes da amostra vão passar por um detector, com um tempo de retenção que lhes é característico, já que depende do seu modo de interacção com a fase estacionária. O detector emite um sinal eléctrico que é função da concentração do componente eluído e do qual resulta num pico no cromatograma. Em HPLC utilizam-se uma variedade de detectores (Fluorescência, Electroquímico, Ultra-Violeta e de Espectrometria de Massa) cuja selecção depende da natureza do analito. O detector DAD é usado para moléculas cromóforas, e mede um espectro de absorção num determinado intervalo de comprimentos de onda. **6.** O cromatograma obtido para cada amostra é visualizado num computador com o software adequado (Wilson and Walker, 1999).

O método de HPLC, operando num modo de fase reversa com eluição isocrática e com detector DAD, otimizado previamente para a identificação e quantificação de ergosterol, brassicasterol, 7-dehidrocolesterol (7-DHC) e colesterol e, para a avaliação da actividade enzimática da DHCR7 (ver Anexo A), foi aplicado à análise de diversos esteróis: 7-DHC, colesterol, desmosterol, lanosterol, latosterol, colestanol e β -sitosterol, para a posterior aplicação do método na quantificação destes esteróis em LA.

3.3.2. Procedimento

Para a análise de esteróis por HPLC, o procedimento inclui:

- A. Preparação dos padrões diluídos;
- B. Análise por HPLC.

Inicialmente começou-se por (1) identificar o tempo de retenção de cada esterol, isoladamente, e depois (2) separar os diversos esteróis numa mesma análise cromatográfica, utilizando-se misturas de padrões de esteróis, com o intuito final de avaliar a capacidade do método HPLC-DAD para separar e identificar os diversos esteróis.

A. Preparação dos padrões diluídos

A partir das soluções mãe de 7-DHC, colesterol, desmosterol, lanosterol, latosterol, colestanol e β -sitosterol (1mM), prepararam-se misturas padrão com todos os esteróis, de concentrações de 250, 125, 62.5 e 31.25 μ M (utilizando a fase móvel metanol/H₂O (100:4) para diluir). Também foram preparados padrões de cada esterol isolado a 250 e 125 μ M, que serviram de base para a identificação dos compostos e confirmação dos respectivos tempos de retenção, na análise cromatográfica.

Utilizou-se como padrão interno o epicoprostanol na concentração de 0.16mM.

B. Análise por HPLC

Antes de efectuar uma análise por HPLC, a coluna C-18, 5 μ m, foi deixada a equilibrar com fase móvel de um dia para o outro.

A análise por HPLC-DAD dos padrões dos diversos esteróis, foi efectuada com as seguintes condições:

- Eluição isocrática (fase móvel de metanol/água 100:4);

- Tempo de corrida 40 minutos;
- Temperatura 30°C;
- Taxa de fluxo: 1 ml/min.;
- Volume de injeção da amostra: 100µl;
- Detector DAD com variação do comprimento de onda entre 200-400nm e com comprimento de onda fixo nos 210nm.



Figura 3.2. Equipamento de HPLC (*Lachrom, Merck Hitashi*) com detector DAD (*Hitachi, modelo L-7455*) utilizado.

A série de análises iniciou-se quando se registou estabilidade na linha de base. Foi feita uma lista de injeção no menu correspondente do Software HSM-system 1 e dada ordem de arranque. Os cromatogramas obtidos foram analisados recorrendo-se à integração manual e automática, para a determinação das áreas dos vários picos cromatográficos.

3.4. Método de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS) para a quantificação de esteróis em líquidos amnióticos

3.4.1. Introdução à Metodologia

As técnicas de **cromatografia gasosa (GC)** e **espectrometria de massa (MS)** têm requerimentos específicos relativamente aos compostos em análise. A técnica de GC requer compostos gasosos ou líquidos voláteis, e para a análise por MS, a pureza dos compostos é um factor essencial. Assim, as amostras biológicas raramente são adequadas para análise por GC-MS, sem que antes sejam sujeitas a um processo de tratamento pré-analítico.

A combinação destas duas técnicas tem mais-valias, dado que a primeira separa, com grande resolução os constituintes de uma mistura, e a segunda, fornece informações estruturais detalhadas para a maioria dos compostos de modo a identificá-los com exactidão (Wilson and Walker, 1999).

A **cromatografia gasosa (GC)**, baseia-se na utilização de um gás quimicamente inerte como fase móvel, que arrasta os diferentes componentes da amostra a analisar. Os gases mais utilizados são o hélio, o hidrogénio, argón e o azoto, fluídos compressíveis que devem apresentar um grau elevado de pureza e serem utilizados a uma pressão baixa e sensivelmente constante. A fase estacionária pode ser constituída por um sólido ou por um líquido e, em qualquer dos casos, encontra-se contida num tubo de aço inoxidável, vidro, sílica ou qualquer outro material inerte, designando-se o sistema assim constituído por coluna cromatográfica (Wilson and Walker, 1999).

O cromatógrafo é constituído por uma fonte de gás de arraste, um injector e porta de injeção, uma coluna cromatográfica contida dentro de um forno, um detector e uma unidade de aquisição e processamento de dados (Wilson and Walker, 1999).

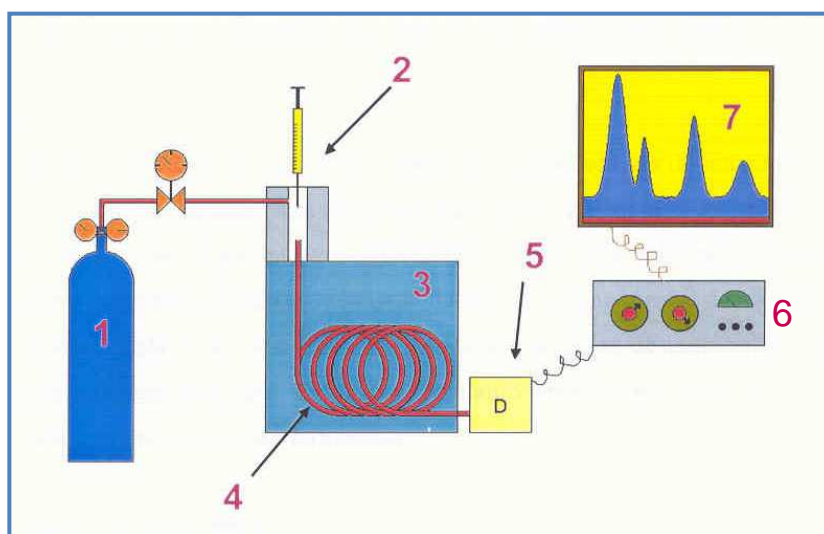


Figura 3.3. Representação esquemática de um sistema de GC: 1- Reservatório de gás e controlo de fluxo/pressão; 2- Injector; 3- Forno da coluna; 4- Coluna cromatográfica; 5- Detector; 6- Unidade de tratamento e aquisição de dados; 7- Cromatograma.

Uma pequena quantidade de amostra a analisar é injectada no cromatógrafo, através do injetor aquecido a altas temperaturas, o que permite uma rápida volatilização de todos os componentes da mistura a analisar, antes da entrada na coluna. Os componentes são arrastados por um gás inerte, que está continuamente a fluir. A coluna enrolada em hélice, situa-se dentro de um forno de temperatura regulável. Dado que a velocidade, a eficiência e a reprodutibilidade da separação são extremamente dependentes da temperatura, a sua regulação é um parâmetro essencial neste tipo de cromatografia. A temperatura da coluna pode manter-se constante ao longo do processo cromatográfico, ou subir gradualmente de forma linear ou por patamares, sendo este o processo mais utilizado na análise de misturas complexas. A capilaridade da coluna é outro ponto crítico, uma vez que uma menor probabilidade de co-eluições implica um maior poder de separação, o que por sua vez depende das características físico-químicas dos compostos a analisar e da própria coluna (Karasek and Ray, 1988; Wilson and Walker, 1999).

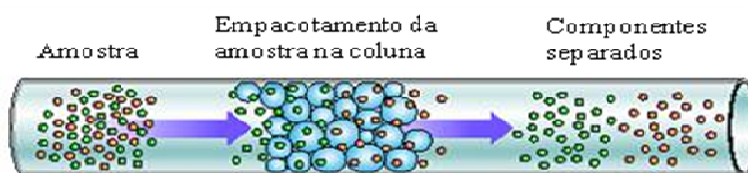


Figura 3.4. Esquema representativo da separação de componentes de uma amostra num aparelho de cromatografia gasosa (retirado e adaptado de www.uma.pt/igc/iGC.html, no dia 16/5/08).

É com base na propriedade física e química dos componentes da amostra que as condições de um método são estabelecidas, para no fim se detectarem os componentes de interesse à saída da coluna cromatográfica. A grande vantagem desta técnica é a alta resolução que é possível atingir, permitindo separar múltiplos componentes de uma amostra complexa. A velocidade de deslocação de cada componente é proporcional à velocidade de deslocação do gás e à programação das temperaturas, sendo esta dependente da sua tensão de vapor e da sua afinidade para a fase estacionária. Uma escolha adequada da coluna cromatográfica, das temperaturas inicial e final e do fluxo do gás de arraste, irá proporcionar a chegada de cada componente ao detector, a um tempo diferente dos restantes. O sinal transmitido pelo detector permite conhecer o tempo de retenção característico de cada composto para a sua posterior quantificação, pela área do pico correspondente (Tanaka *et al.*, 1980; Wilson and Walker, 1999).

O detector é um dispositivo que produz um sinal quando há passagem de substâncias diferentes do gás de arraste e que permite assim, a detecção dos compostos eluídos da coluna cromatográfica. Em condições ideais, o sinal emitido é proporcional à quantidade dos compostos eluídos. As características mais importantes para a escolha de um determinado tipo de detector são: (i) a sensibilidade (que define a relação entre o incremento de área do pico e o incremento de massa do analito), (ii) a linearidade (que corresponde à proporcionalidade entre o sinal produzido pelo detector e a quantidade de substância que o atravessa) e (iii) a selectividade (que refere a especificidade do detector para responder apenas a determinado tipo de compostos) (Karasek and Ray, 1988; Wilson and Walker, 1999).

A **espectrometria de massa** (MS) baseia-se no princípio de que partículas carregadas, movendo-se ao longo de um campo eléctrico ou magnético, podem ser separadas de acordo com a sua relação massa/carga (m/z). O processo requer uma etapa inicial, na qual as

moléculas da amostra são ionizadas e fragmentadas. Depois, mediante o ajuste dos parâmetros analíticos, são seleccionados os iões em função do seu valor de m/z , que são detectados numa gama de massas em função do tempo (por varrimento ou por “ião selectivo”) (Wilson and Walker, 1999).

A análise das substâncias por MS implica a sua vaporização prévia e posterior ionização. O impacto electrónico, é o processo mais utilizado para a ionização, onde electrões gerados por um filamento metálico incandescente bombardeiam a amostra. Os fragmentos ionizados carregados positivamente são repelidos pelo eléctrodo positivo e conduzidos ao separador magnético. Após a sua separação, é efectuado um registo dos iões formados para cada composto, relacionando a sua abundância relativa com os respectivos valores de m/z , o qual é designado por espectro de massa, e representa uma espécie de “impressão digital” da substância (Fernandes, 1993; Wilson and Walker, 1999).

A unidade de aquisição e tratamento de dados recebe o sinal eléctrico enviado pelo detector e transforma-o num gráfico, o cromatograma, em que é representada a resposta do detector em função do tempo. O princípio básico de quantificação é baseado na relação proporcional entre a área dos picos registada no cromatograma e a concentração do composto injectada. Assim, é fundamental para a fiabilidade da análise que a área dos picos seja medida da forma mais exacta e reprodutível possível. Os tempos de retenção dos picos cromatográficos e a análise dos espectros correspondentes a cada pico, permitem a identificação dos compostos presentes, por vezes, por comparação dos espectros obtidos com os existentes na biblioteca informática de espectros, ou recorrendo a tabelas de espectros, onde estão referidos o principais iões, tempos de retenção e pesos moleculares respectivos (Fernandes, 1993).

Num **sistema de cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC-MS)**, o cromatógrafo actua como um sistema de introdução da amostra no detector MS e, a sua utilização permite a chegada de cada substância à câmara de ionização, como um componente puro, separado de todos os outros componentes da amostra a analisar (Wilson and Walker, 1999).

Para além do seu elevado grau de complementaridade, as duas técnicas são compatíveis em vários aspectos importantes, designadamente na ordem de grandeza da

quantidade de amostra necessária à análise, em cada uma das técnicas, além de ambas as técnicas requerem a presença da amostra em fase gasosa. Contudo, existem algumas incompatibilidades relacionadas com as diferenças de pressão a que as diferentes técnicas analíticas operam, a GC requer gás de arrastamento que flua através de uma coluna cromatográfica, a uma pressão maior ou igual a 1 atmosfera ($\geq 1.32 \times 10^{-3}$ Torr) e a MS trabalha sob vácuo (pressão da ordem dos 10^{-5} Torr). Desta forma, foram criados dispositivos de interfase para reduzir a pressão do fluxo do solvente, proveniente do cromatógrafo para o espectrómetro de massa, eliminando simultaneamente, a maior parte do gás de arraste, permitindo transportar a maior quantidade possível de eluído, diminuindo a sua pressão. O desenvolvimento tecnológico levou ao aparecimento de sistemas de vácuo mais dinâmicos e de maior capacidade e, de colunas capilares para a GC que, além de proporcionarem resoluções muito mais eficazes, funcionam com menor fluxo de gás (Fernandes, 1993; Wilson and Walker, 1999).

3.4.2. Princípio do método

O método cromatográfico GC-MS foi desenvolvido e aferido para permitir a separação e a detecção simultânea de diversos esteróis, em amostras biológicas.

Para o doseamento de compostos em diferentes amostras biológicas, há necessidade de realizar diferentes procedimentos analíticos, com o objectivo de no final, se obter uma amostra com as condições pretendidas e com redução de impurezas e de possíveis interferências à análise.

Os esteróis são lípidos com características lipossolúveis presentes nas amostras biológicas. A adição de etanol absoluto às amostras biológicas promove a precipitação de proteínas e a desorganização das membranas, libertando os lípidos. Posteriormente, os ésteres de colesterol são submetidos a uma hidrólise alcalina a quente. Os lípidos neutros são depois extraídos pela utilização de solventes orgânicos adequados, com agitação mecânica.

Para tornar estes compostos em derivados mais voláteis é necessário derivatizar a amostra, aumentando a volatilidade dos compostos. Os extractos orgânicos são concentrados (por fluxo de azoto) e os esteróis presentes, derivatizados (por siliação) com BSTFA. Esta substância permite a substituição do hidrogénio no grupo carboxílico funcional, formando o correspondente éster. O domínio trimetilsililado formado aumenta consideravelmente o carácter não polar do composto, limitando assim deste modo, as associações intermoleculares,

e induzindo conseqüentemente, um aumento de volatilidade e de estabilidade térmica dos compostos. Os derivados trimetilsiliados assim formados, de elevada volatilidade, são analisados por GC-MS.

3.4.3. Optimização do método Cromatográfico

Para a implementação do método cromatográfico GC-MS com vista à separação, identificação e quantificação de colesterol, 7-DHC, desmosterol, latosterol e β -sitosterol em amostras de LA, procedeu-se inicialmente a uma optimização do método cromatográfico com base na bibliografia disponível (Ahmida *et al.*, 2006; Batta, *et al.*, 1995; Chevy *et al.*, 2005; Haas *et al.*, 2005; Irons and Tint, 1998; Kelley, 1995; Kratz and Kelley, 1999; Nissinen *et al.*, 2000; Mills *et al.*, 1996; Tint *et al.*, 1998).

Como se pretende dosear em simultâneo diferentes esteróis, numa mesma corrida cromatográfica, foram feitas adaptações metodológicas adequadas aos procedimentos previamente descritos. O sistema cromatográfico utilizado é composto por um equipamento de GC-MS (*QP 2010 Plus, Shimadzu*), por um injector automático (*AOC-20i, Shimadzu*) e por um computador com software de controlo (*Labsolutions - GCMS solutions, Shimadzu*). O espectrómetro de massa é um quadrupolo com ionização por impacto electrónico e funciona em modo de varrimento ou por monitorização selectiva de iões (SIM).

Inicialmente injectaram-se, no GC-MS, padrões de colesterol, 7-DHC, desmosterol, latosterol, lanosterol, colestanol, epicoprostanol e β -sitosterol isoladamente e em conjunto numa mistura de esteróis e com diferentes concentrações. Efectuou-se a análise em modo de varrimento, para a obtenção do cromatograma total e desta forma, identificar os picos cromatográficos, os tempos de retenção e os espectros de massa característicos de cada composto.

O colestanol e o lanosterol foram analisados durante a optimização da técnica, de forma a permitir a separação de todos os esteróis de interesse, para que estes não co-eluissem com os outros esteróis de importância clínica para o trabalho e, para que a técnica optimizada possa ser aplicada no futuro no doseamento desses esteróis, se necessário.

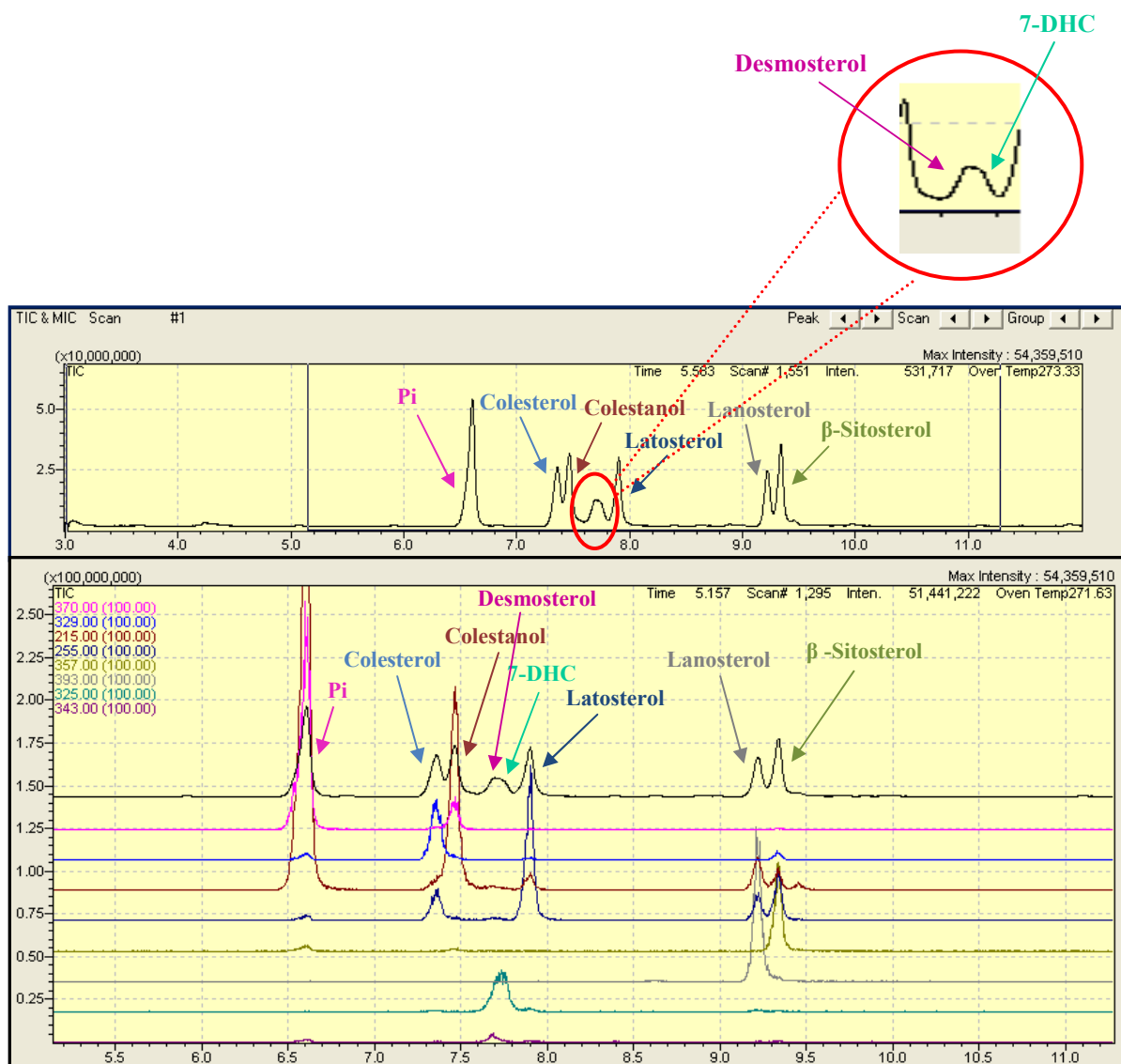
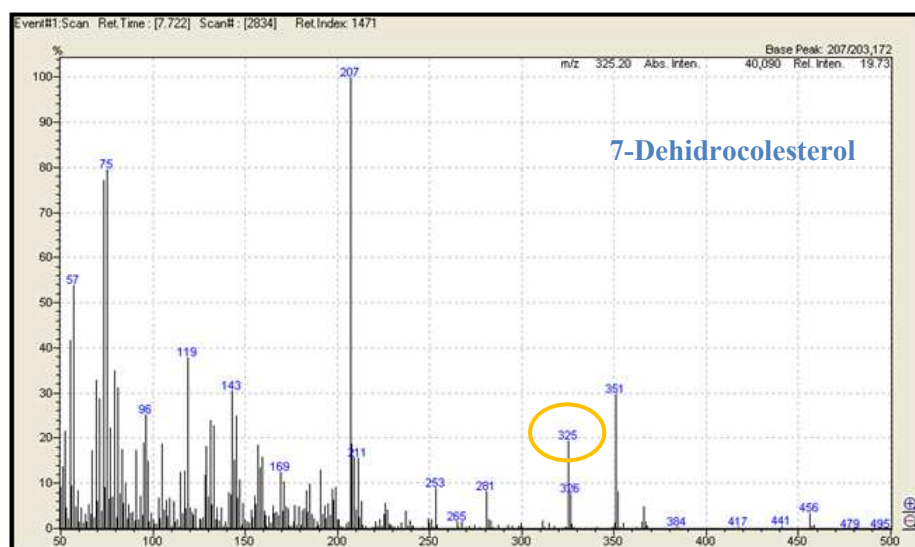
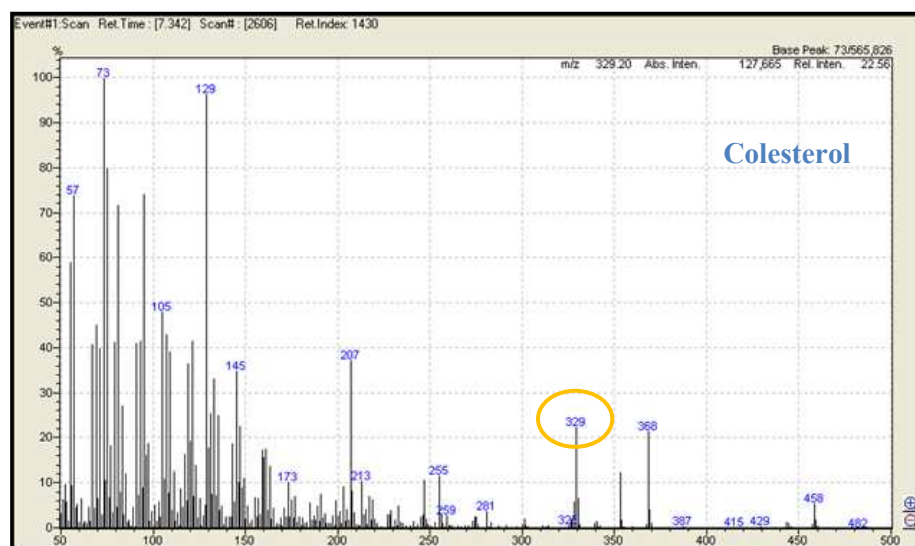
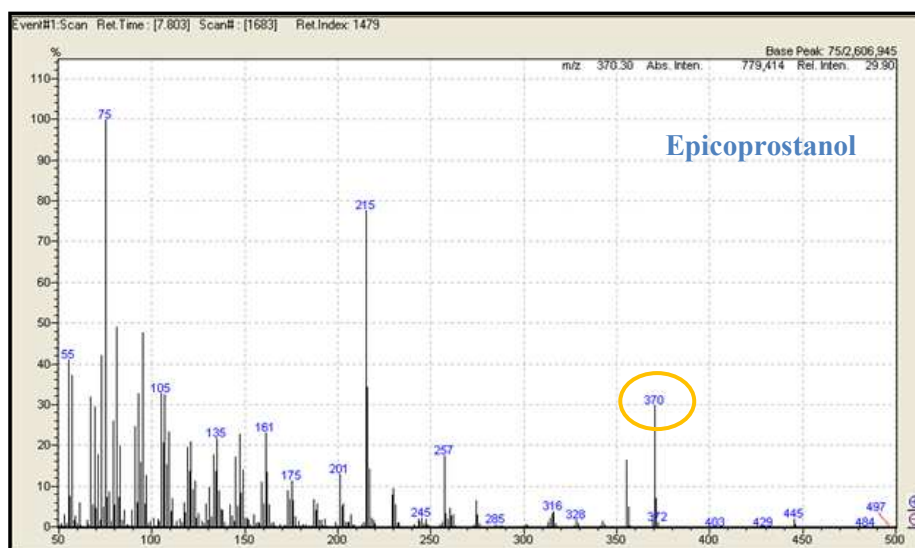
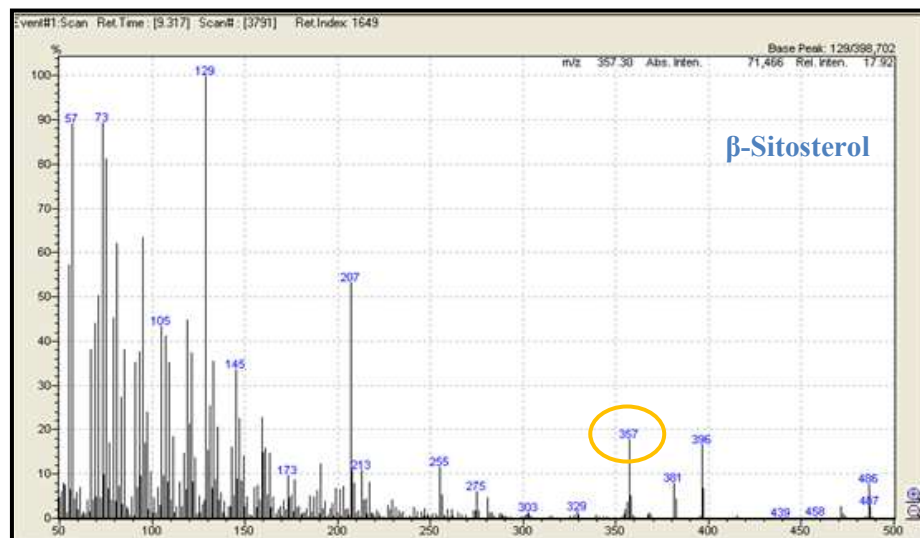
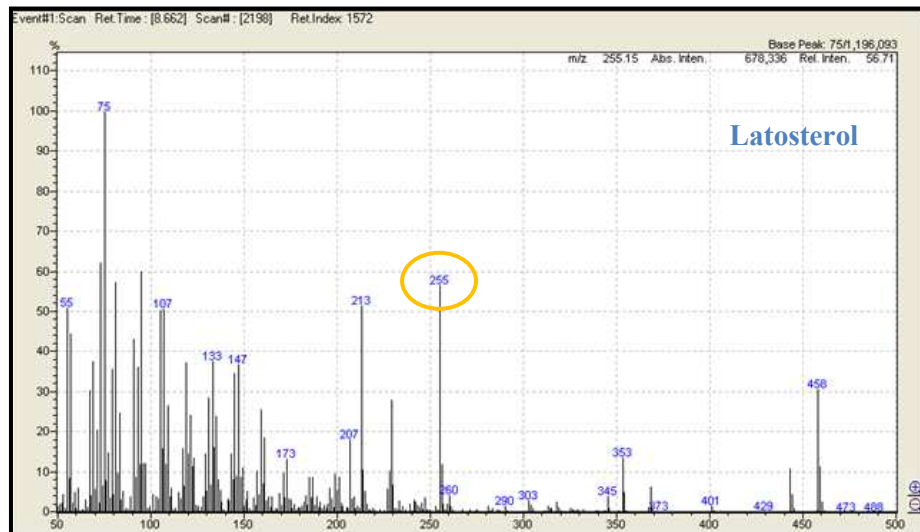
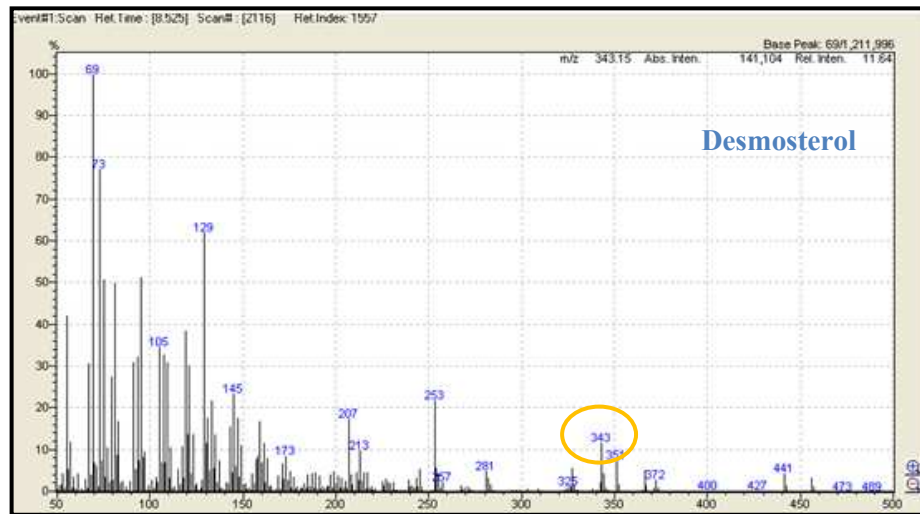
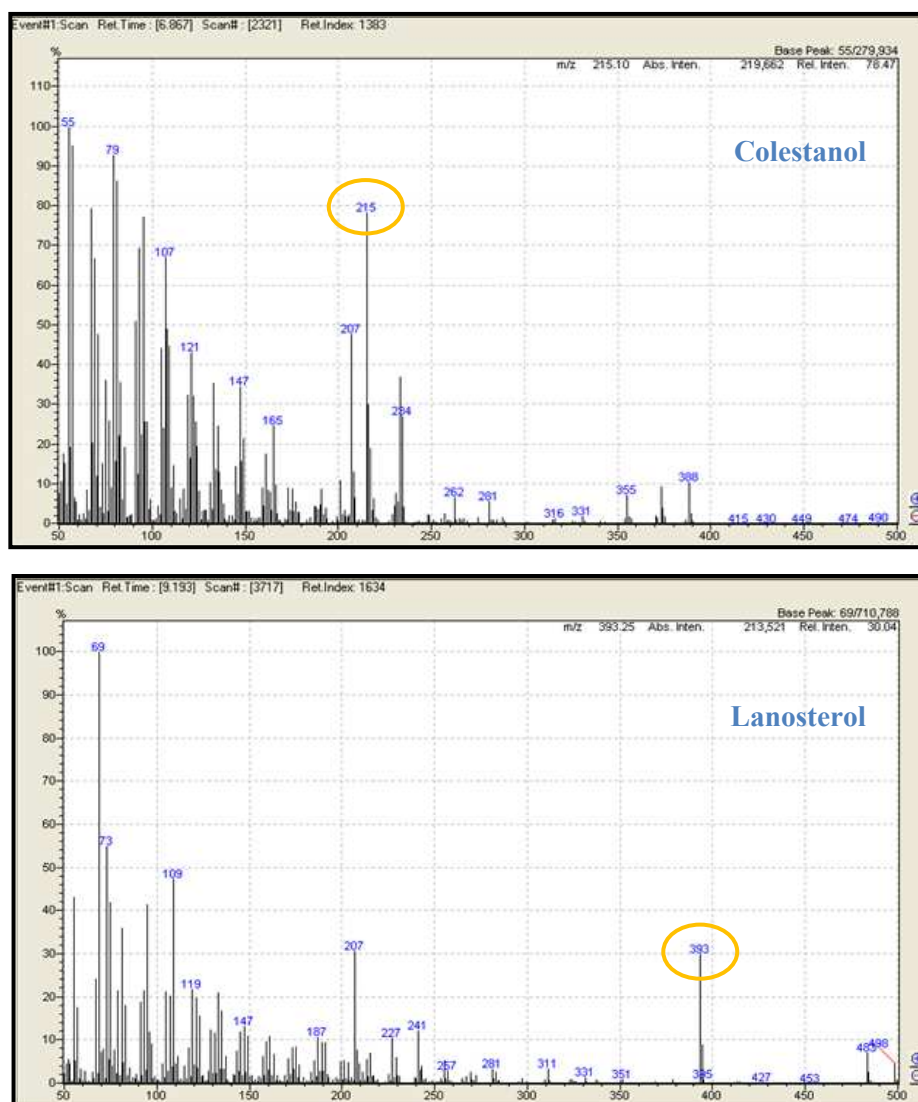


Figura 3.5. Cromatograma de uma mistura de colesterol, 7-DHC, desmosterol, latosterol, lanosterol, colestanol, epicoprostanol e β -sitosterol na concentração de 8 $\mu\text{mol/L}$, adquirido por CG-MS em modo de varrimento. O segundo cromatograma tem representado a cores o comportamento dos iões seleccionados para a análise de cada esterol.

Para a confirmação da identidade dos espectros de massa obtidos para cada esterol (figura 3.6.), compararam-se os espectros obtidos com os existentes na biblioteca informática de espectros, com os principais iões referidos na literatura e, com os espectros de massa obtidos previamente noutro equipamento de GC-MS (HP 6890/HP 5973) de impacto electrónico, em modo varrimento e SIM e, com coluna capilar DB-1 (30m x 0,25 mm x 0,25 μm).







Figuras 3.6. Espectros de massa característicos de epicoprostanol, colesterol, 7-DHC, desmosterol, lanosterol, β -sitosterol, colestanol e de lanosterol, respectivamente, obtidos pelo método GC-MS otimizado, com modo de ionização electrónica em modo de varrimento.

Os iões seleccionados como principais e os mais viáveis para a quantificação dos esteróis (tabela 3.1.), além de serem os referidos na literatura como os mais adequados, são também os mais abundantes no espectro de massa global, aumentando assim a razão sinal/ruído (S/R).

Tabela 3.1. Tabela com os iões seleccionados como principais para cada esterol e respectivos tempos de retenção.

Composto	Iões (m/z)	Tempos de retenção (minutos)
Epicoprostanol	370	7.79
Colesterol	329	8.30
7-DHC	325	8.54
Desmosterol	343	8.52
Latosterol	255	8.66
β-Sitosterol	357	9.45
Colestanol	215	8.38
Latosterol	393	9.20

Legenda: m/z – razão massa/carga observada após a análise por espectrometria de massa; 7-DHC – 7-dehidrocolesterol..

Os compostos são, assim, identificados pelos respectivos tempos de retenção e espectros de massa característicos.

O método GC-MS otimizado destina-se a quantificar os esteróis colesterol, 7-DHC, desmosterol, latosterol e β-sitosterol nas amostras biológicas humanas. Apesar de os padrões de colestanol e lanosterol terem sido utilizados na optimização e aferição do método GC-MS, estes não vão ser doseados neste trabalho.

Para a análise quantitativa dos extractos, por GC-MS, programou-se o método para funcionar em modo de aquisição SIM [modo de ião selectivo: identificação dos compostos pelo iões característicos (m/z)]. O uso do GC-MS operando num modo de aquisição SIM, diminui o ruído de fundo e permite obter uma maior estabilidade da linha de base. Desta forma, a monitorização por iões, para além de originar respostas satisfatórias na quantificação dos esteróis, também permite obter boas sensibilidades e especificidades na análise, aumentando assim a razão S/R e minimizando os erros na determinação quantitativa dos esteróis, devidos a possíveis co-eluições com impurezas da matriz biológica.

O programa utilizado trabalha com janelas de aquisição para cada um dos iões correspondentes aos derivados trimetilsiliados dos compostos a quantificar (tabela 3.2.).

Tabela 3.2. Tabela com as janelas de aquisição para os diferentes iões seleccionados como principais para cada esterol.

Composto	Iões (m/z)	Janela de aquisição (minutos)
Epicoprostanol	370	7.60 – 7.80
Colesterol	329	8.20 – 8.33
7-DHC	325	8.42 – 8.54
Desmosterol	343	8.42 – 8.54
Latosterol	255	8.58 – 8.67
β-Sitosterol	357	9.50 – 9.57

Legenda: 7-DHC – 7-dehidrocolesterol.

3.4.4. Procedimento

Para o **doseamento dos esteróis no líquido amniótico**, o procedimento é constituído por:

- A. Preparação dos padrões de esteróis a partir das soluções mãe;
- B. Preparação das amostras de LA, hidrólise: extração de lípidos e obtenção de extracto seco;
- C. Derivatização;
- C. Análise por GC-MS.

Em cada série analítica, onde são preparadas as amostras de LA, são sempre estabelecidas em simultâneo as curvas de calibração para cada esterol e analisada uma “pool” de amostras LA controlo de 16 semanas de gestação, que corresponde ao controlo de qualidade interno (CQI). Os esteróis extraídos das amostras de LA, são quantificados pelas curvas de calibração preparadas no mesmo ensaio.

O CQI permite validar a série (verifica se as soluções padrão adicionadas, se mantêm estáveis com o passar do tempo, ou se há degradação ou contaminação das amostras e padrões), garantir que a resposta diária é constante e, avaliar a linearidade, repetibilidade e reprodutibilidade do método.

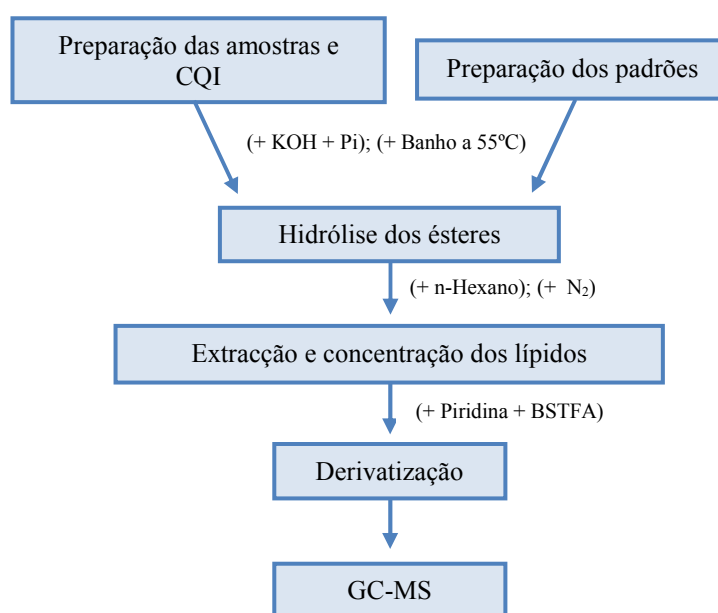


Figura 3.7. Representação esquemática das diversas etapas necessárias para a preparação das amostras de LA e doseamento de esteróis até à análise por GC-MS.

A. Preparação dos padrões de esteróis a partir das soluções mãe

Com as soluções mãe de colesterol, 7-DHC, desmosterol, latosterol e β -sitosterol de concentração 1mM, preparam-se misturas padrões de 100 e 10 μ M (os frascos com soluções foram envolvidos em prata e bem rolhados), para a curva de calibração e para os ensaios de determinação da sensibilidade do método.

B. Preparação das amostras de LA: hidrólise, extração de lípidos e obtenção de extracto seco

- 1) Descongelaram-se os líquidos amnióticos à temperatura ambiente (T.A.)
- 2) As amostras são sempre extraídas ao mesmo tempo e nas mesmas condições que os padrões para a curva de calibração.
- 3) Pipetaram-se para tubos de rolha de 10 mL os reagentes e as amostras de acordo com a seguinte tabela:

Tabela 3.3. Tabela com os reagentes e soluções padrão necessários para a preparação das amostras de LA e curva de calibração.

Calibração ($\mu\text{mol/L}$)		Volumes a adicionar (μL)			
		H ₂ O	Colesterol (100 $\mu\text{mol/L}$)	Mistura de Esteróis (7-DHC, desmosterol, latosterol, β -sitosterol) (10 $\mu\text{mol/L}$)	Etanol 96%
L1	P0 _E + P0 _C	400	0	0	1000
L2	P0,5 _E + P5 _C	400	50	50	900
L3	P1 _E + P10 _C	400	100	100	800
L4	P2 _E + P20 _C	400	200	200	600
L5	P5 _E + P40 _C	400	400	500	100
L6	P10 _E + P60 _C	400	600	100*	300
Ensaio – Preparação das amostras					
LA (13 – 16 semanas)		1000	0	0	400
LA (17 –> 22 semanas)		500	0	0	900
Controlo LA		1000	0	100	300

Legenda: 7-DHC – 7-dehidrocolesterol; (*) Mistura de esteróis (7-DHC, desmosterol, latosterol, β -sitosterol) de 100 $\mu\text{mol/L}$.

Nota: O P0,5_E + P5_C corresponde à quantidade de 0,5nmol da mistura de esteróis e 5nmol de colesterol; O P1_E + P10_C corresponde à quantidade de 1nmol da mistura de esteróis e 10nmol de colesterol; O P2_E + P20_C corresponde à quantidade de 2nmol da mistura de esteróis e 20nmol de colesterol; O P5_E + P40_C corresponde à quantidade de 5nmol da mistura de esteróis e 40nmol de colesterol; O P10_E + P60_C corresponde à quantidade de 10nmol da mistura de esteróis e 60nmol de colesterol.

- 4) Com a ajuda de uma micropipeta, adicionaram-se 100 μL de epicoprostanol 0.16mmol/L (Pi) e 500 μL da solução de KOH 0.16M, a cada tubo de extração de lípidos (tubos de fundo redondo com rolha).
- 5) Os tubos foram colocados no banho de água durante 15 min. a 55°C, de forma a promover a **hidrólise**.
- 6) Retiraram-se os tubos do banho e colocaram-se a arrefecer à T.A.
- 7) A cada tubo adicionou-se 4 mL de n-hexano p.a. e 1mL de H₂O destilada.

- 8) Os tubos de extracção foram colocados num agitador automático durante 10 minutos **(extracção)**.
- 9) Depois foram centrifugados durante 2 minutos a 4000 rpm.
- 10) Com a ajuda de uma pipeta de vidro, transferiu-se o sobrenadante (fase orgânica) de cada tubo de extracção para tubos de fundo cónico (sem tocar na interfase). A fase aquosa foi rejeitada.
- 11) A fase orgânica foi evaporada em corrente de azoto à T.A. até se obter $\pm 0.5\text{mL}$ de extracto **(concentração)**.
- 12) Transferiram-se os extractos concentrados resultantes para “vials” e levaram-se os mesmos, à secura total sob corrente de azoto.

C. Derivatização

- 1) Ao extracto seco foram adicionados $50\mu\text{L}$ de piridina e $50\mu\text{L}$ de BSTFA.
- 2) Os “vials” foram capsulados e colocados na estufa a 60°C , durante 30 minutos.
- 3) Retiram-se os “vials” da estufa e colocaram-se a arrefecer à T.A.
- 4) Descapsularam-se os “vials” e as amostras derivatizadas foram transferidas para “inserts”, colocados nos mesmos “vials, os quais foram re-capsulados e colocados no suporte do injector automático.
- 5) Selecionou-se o método de aquisição e análise de dados no computador.

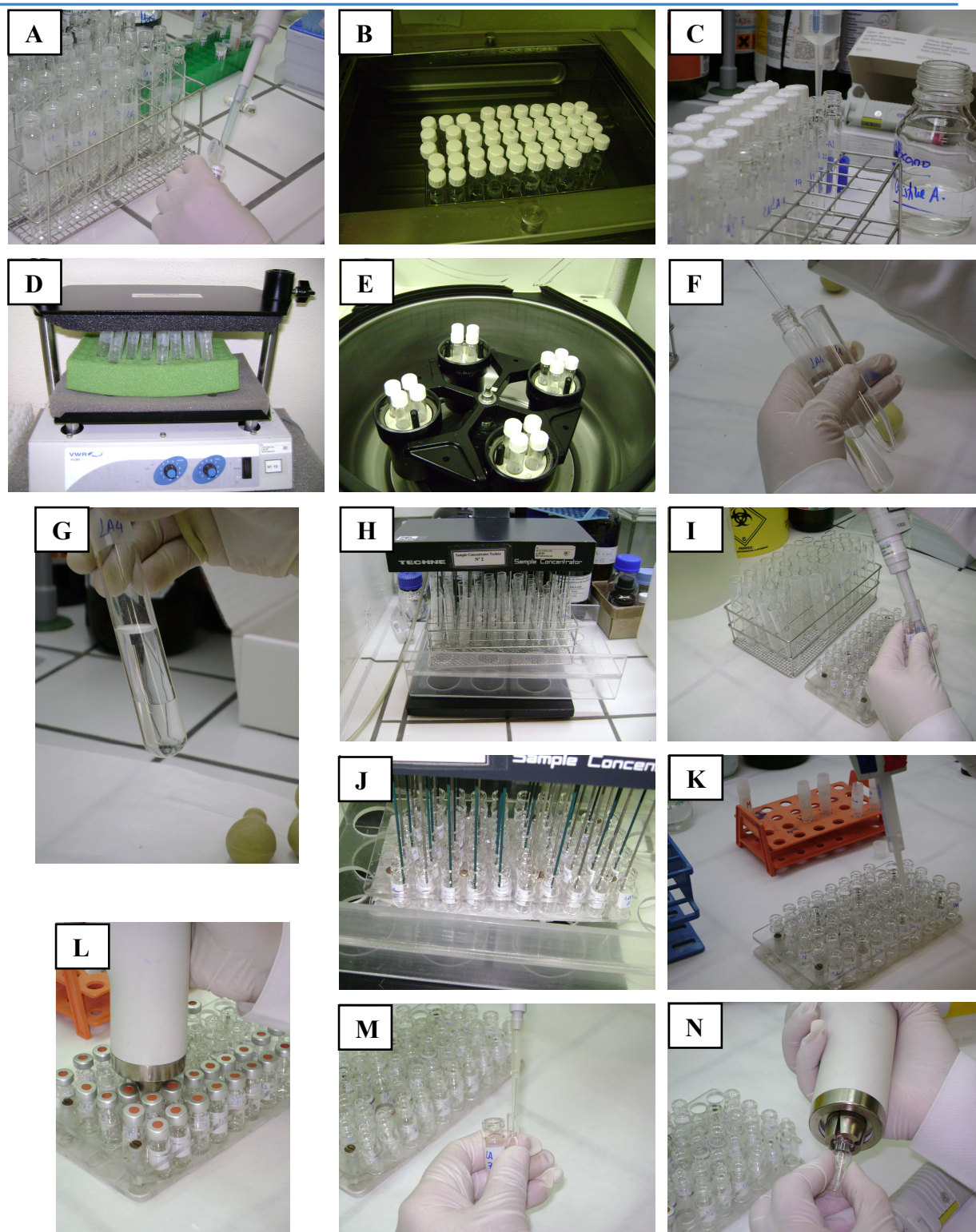


Figura 3.8. Sequência da preparação das amostras de LA desde a hidrólise, extracção de lípidos, obtenção do extracto seco até à derivatização. A imagem A representa o passo 3, a imagem B o passo 5, a imagem C o passo 7, a imagem D o passo 8, a imagem E o passo 9, as imagens F e G o passo 10, a imagem H o passo 11 e as imagens I e J o passo 12 do protocolo da preparação das amostras por hidrólise, extração de lípidos e obtenção do extracto seco. A imagem K representa o passo 1, a imagem L o passo 2 e as imagens M e N o passo 4 do protocolo da derivatização das amostras.

D. Análise por GC-MS

Os derivados trimetilsiliados formados, de elevada volatilidade são analisados por **cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa**, GC-MS (*QP 2010 Plus, Shimadzu*), operando no modo de ião selectivo (SIM). Utiliza-se um cromatógrafo de fase gasosa com detector de massa de impacto electrónico. A injeção é automática, sendo o volume injectado de 1µl, com razão de split de 1:40. A coluna capilar utilizada é apolar, de sílica (Coluna *EquityTM-1, Supelco*), com 15m de comprimento, 0.1 mm de diâmetro interno e 0.1µm de espessura de filme. O gás de arrasto é o Hélio a uma pressão de 535.9 kPa (fluxo total de 25.7mL/min; fluxo da coluna de 0.55mL/min). A temperatura do injector é de 300°C e a da linha de transferência 290°C.

O programa utilizado e optimizado no software (*Labsolutions – GCMS solutions, Shimadzu*) parte de uma temperatura inicial de 250°C durante 2 minutos e 60 segundos, subindo depois à velocidade de 8°/min até 300°C. A duração da corrida foi de 11 minutos e 5 segundos.

A análise cromatográfica qualitativa é feita com base nos tempos de retenção e no espectro de massa (TIC) característico para cada esteroide e a quantificação dos esteróis é feita no modo SIM, através da integração das áreas apresentadas pelos respectivos picos, pelo método do padrão interno (razão entre a área do composto e a área do padrão interno, Pi) e utilizando curvas de calibração, minimizando-se assim eventuais problemas que possam ocorrer durante o processo analítico.



Figura 3.9. Equipamento de cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massa (*QP 2010 Plus, Shimadzu*).

3.4.5. Validação do método

Para a validação do método de GC-MS foram determinados os seguintes parâmetros: a linearidade, a repetibilidade, a reprodutibilidade, a taxa de recuperação, o limite inferior de detecção (LID) e o limite inferior de quantificação (LIQ).

3.4.5.1. Linearidade do método

Para determinar a linearidade do método foram feitas 3 curvas de calibração para cada um dos esteróis.

Para as curvas de calibração do 7-DHC, desmosterol, latosterol e β -sitosterol a gama de concentrações variou entre 0.5 - 10 μ M (0.5, 1, 2, 5, 10 μ M) e para a curva de calibração do colesterol o intervalo de concentrações foi de 5 - 60 μ M (5, 10, 20, 40, 60 μ M), fazendo-se sempre um ponto P0 que corresponde à preparação de um padrão para as curvas de calibração onde apenas é adicionado o padrão interno. Os intervalos de concentrações dos esteróis variaram, de forma às curvas de calibração incluírem pontos de interesse de acordo com uma população normal, assim como valores patológicos.

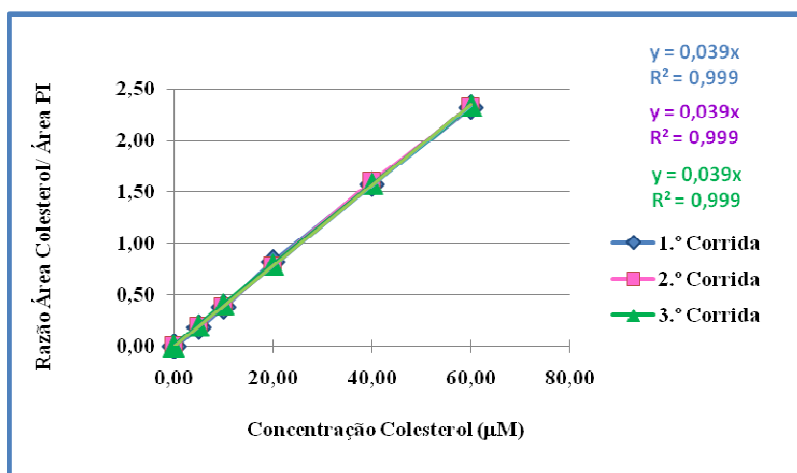


Figura 3.10. Curvas de calibração do **colesterol** para o intervalo de concentrações 5 – 60 μ M. A linha em azul corresponde aos resultados obtidos para a primeira curva de calibração, a linha em rosa à segunda curva e a linha em verde à terceira curva de calibração. As linhas mais claras com as cores respectivas a cada curva/corrida, representam às linhas de tendência. A equação da recta para o colesterol, dada pelas três curvas de calibração, é $y = 0,039 \cdot x$ e o $R^2 = 0,999$.

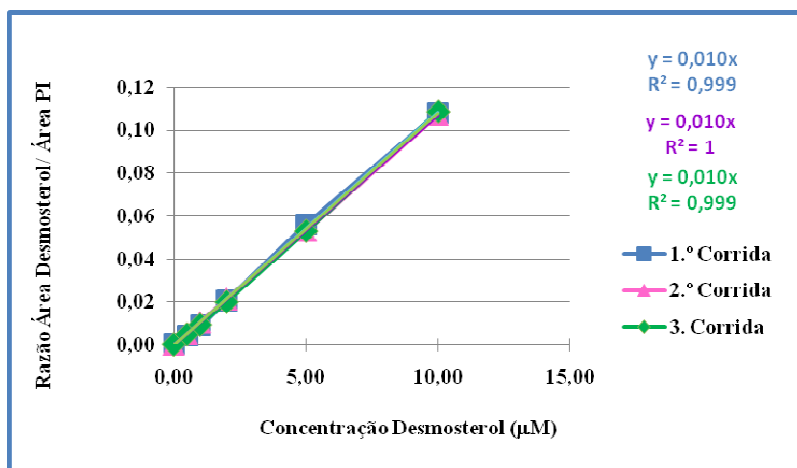


Figura 3.11. Curvas de calibração do **desmosterol** para o intervalo de concentrações 0,5 – 10 µM. A linha em azul corresponde aos resultados obtidos para a primeira curva de calibração, a linha em rosa à segunda curva e a linha em verde à terceira curva de calibração. As linhas mais claras com as cores respectivas a cada curva/corrida, representam às linhas de tendência. A equação da recta para o desmosterol, dada pelas três curvas de calibração, é $y = 0,010 \cdot x$ e o $R^2 = 0,999$, para a primeira e terceira curvas de calibração, sendo para a segunda curva $R^2 = 1$.

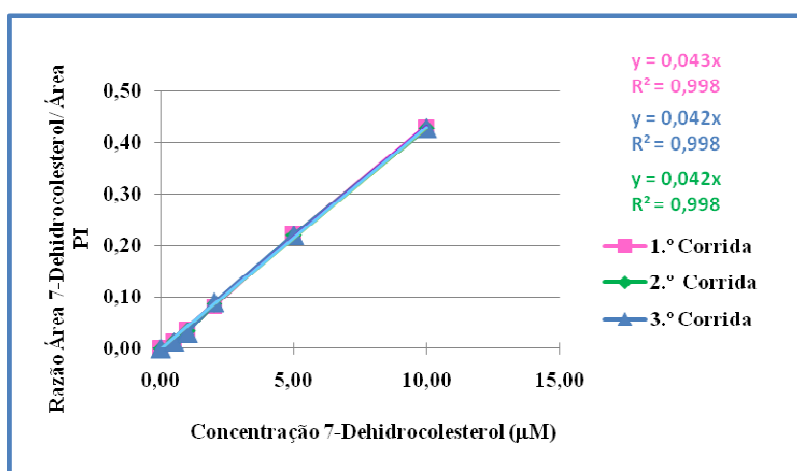


Figura 3.12. Curvas de calibração do **7-dehidrocolesterol** para o intervalo de concentrações 0,5 – 10 µM. A linha em rosa corresponde aos resultados obtidos para a primeira curva de calibração, a linha em verde à segunda curva e a linha em azul à terceira curva de calibração. As linhas mais claras com as cores respectivas a cada curva/corrida, representam às linhas de tendência. A equação da recta para o 7-dehidrocolesterol, dada pela segunda e terceira curvas de calibração, é $y = 0,042 \cdot x$ e pela primeira curva é $y = 0,043 \cdot x$, sendo o $R^2 = 0,998$ para ambas as curvas de calibração.

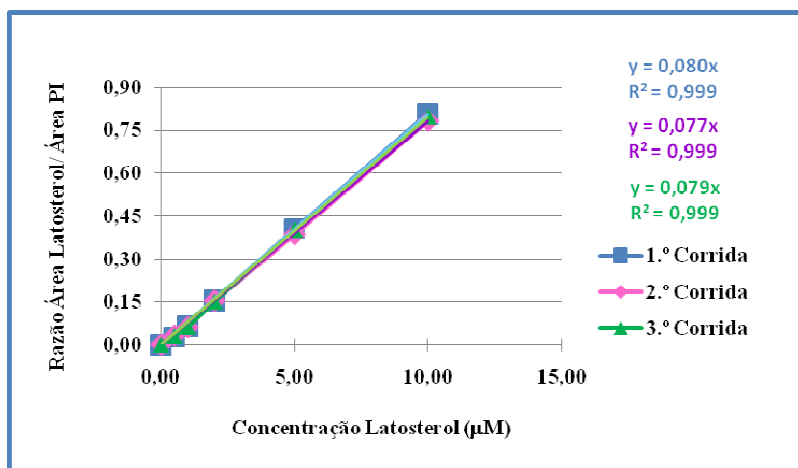


Figura 3.13. Curvas de calibração do **latosterol** para o intervalo de concentrações 0.5 – 10 µM. A linha em azul corresponde aos resultados obtidos para a primeira curva de calibração, a linha em rosa à segunda curva e a linha em verde à terceira curva de calibração. As linhas mais claras com as cores respectivas a cada curva/corrida, representam às linhas de tendência. A equação da recta para o latosterol, dada pela primeira curva de calibração, é $y = 0,080.x$, pela segunda curva é $y = 0,077.x$, pela terceira curva é $y = 0,079.x$ sendo o $R^2 = 0,999$ para ambas as curvas de calibração.

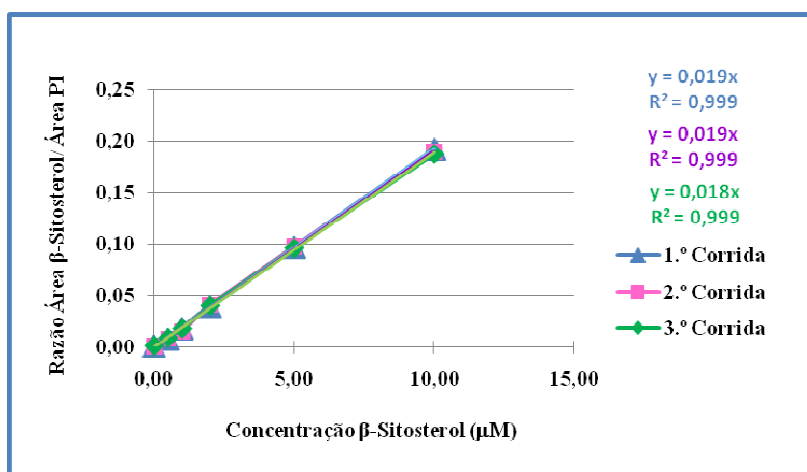


Figura 3.14. Curvas de Calibração do **β-sitosterol** para o intervalo de concentrações 0.5 – 10 µM. A linha em azul corresponde aos resultados obtidos para a primeira curva de calibração, a linha em rosa à segunda curva e a linha em verde à terceira curva de calibração. As linhas mais claras com as cores respectivas a cada curva/corrida, representam às linhas de tendência. A equação da recta para o β-sitosterol, dada pela primeira e segunda curvas de calibração é $y = 0,019.x$ e pela terceira curva é $y = 0,018.x$, sendo o $R^2 = 0,999$ para ambas as curvas de calibração.

Para todos os esteróis, as curvas de calibração apresentaram um R^2 praticamente igual a um, o que significa, como se comprova pelas linhas de tendência, que o método é linear e que a variação da concentração segue um padrão linear para todos os esteróis.

3.4.5.2. Repetibilidade

Para a determinação da repetibilidade do método, uma mesma amostra de LA controlo (sobrecarregada com uma mistura padrão de 7-DHC, latosterol, desmosterol e β -sitosterol com concentração de $1\mu\text{M}$) foi extraída e analisada cinco vezes, numa mesma série, no mesmo dia e, sob as mesmas condições de ensaio. Para avaliar a repetibilidade calculou-se o coeficiente de variação (%) intra-série (quanto menor for o coeficiente de variação em %, maior é a repetibilidade).

O cálculo das concentrações dos esteróis foi feito utilizando o método do padrão interno, por interpolação, da razão área composto/área P_i , à recta de calibração de cada esterol, utilizando a respectiva equação. As concentrações (μM) dos esteróis, em cada extração da amostra LA, e os coeficientes de variação (%) intra-série são apresentados na tabela 3.4.

Tabela 3.4. Tabela com as concentrações determinadas para cada esterol, em cada extração da amostra LA, e respectivos coeficientes de variação intra-série, para a avaliação da repetibilidade do método.

Ensaio	Concentração (μM)				
	Colesterol	Desmosterol	7-DHC	Latosterol	β -Sitosterol
1.º	34.381	1.111	1.002	1.085	1.063
2.º	35.226	1.054	1.004	1.070	1.040
3.º	33.792	1.109	0.999	1.059	1.047
4.º	35.256	1.112	1.012	1.037	1.058
5.º	34.426	1.108	1.001	1.029	1.049
Média	34.616	1.099	1.004	1.056	1.051
Desvio Padrão	0.623	0.025	0.005	0.023	0.009
Coef. Variação (%)	1.8	2.3	0.5	2.2	0.9

Como se verifica pela tabela 3.4., os coeficientes de variação intra-série para cada esterol, são inferiores a 5% e próximos de 1%, sendo mesmo inferior a 1% para o 7-DHC e β -

sitosterol, pelo que este método mostrou ter uma boa repetibilidade intra-série para todos os esteróis.

3.4.5.3. Reprodutibilidade

Para a determinação da reprodutibilidade do método, uma mesma amostra de LA controlo (sobrecarregada com uma mistura padrão de 7-DHC, latosterol, desmosterol e β -sitosterol com concentração de $1\mu\text{M}$) foi extraída e analisada cinco vezes, em 15 dias diferentes. Para avaliar a reprodutibilidade calculou-se o coeficiente de variação (%) inter-série (quanto menor for o coeficiente de variação em %, maior é a reprodutibilidade).

O cálculo das concentrações dos esteróis foi feito como descrito anteriormente. Os valores médios de concentração para cada esterol e em cada série, assim como os respectivos coeficientes de variação (%) inter-série são apresentados na tabela 3.5.

Tabela 3.5. Tabela com os valores médios de concentração obtidos para cada esterol, em cada série, e respectivos coeficientes de variação inter-série, para a avaliação da reprodutibilidade do método.

Tempo (dias)	Concentração (μM)				
	Colesterol	Desmosterol	7-DHC	Latosterol	β -Sitosterol
1.º	33.985	1.134	1.001	1.067	1.034
2.º	32.985	1.131	1.019	1.047	1.034
3.º	32.812	1.102	1.010	1.052	1.059
4.º	32.887	1.172	0.974	1.039	1.073
5.º	34.131	1.175	0.978	1.056	1.051
6.º	34.407	1.074	1.014	1.127	1.057
7.º	36.033	1.039	1.002	1.065	1.097
8.º	32.843	1.021	1.020	1.077	1.076
9.º	33.995	1.095	0.989	1.064	1.099
10.º	34.491	1.082	0.973	1.077	1.042
11.º	35.509	1.163	1.002	1.014	1.045
12.º	34.841	1.120	1.006	0.992	1.004
13.º	33.561	1.156	1.023	1.102	1.031
14.º	35.244	1.074	0.992	1.067	1.058
15.º	34.146	1.144	1.009	1.102	1.103
Média	34.125	1.112	1.001	1.063	1.057
Desvio Padrão	1.003	0.048	0.016	0.034	0.028
Coef. Variação (%)	2.9	4.3	1.6	3.2	2.7

Como se verifica pela tabela 3.5., os coeficientes de variação inter-série para cada esterol, são inferiores a 5% e próximos de 1% (7-DHC), pelo que este método mostrou ter uma boa reprodutibilidade inter-série para todos os esteróis.

3.4.5.4. Cartas Controlo

O controlo estatístico de qualidade assume hoje em dia uma importância fundamental, pois os seus métodos estatísticos permitem detectar formas invulgares de variação, determinar alterações nos valores dos parâmetros do processo e identificar factores que influenciam as características do processo. Introduzida por Walter Shewhart, no final dos anos 30, a carta de controlo é uma das principais ferramentas estatísticas do controlo estatístico de qualidade, pois, permite avaliar e controlar o desempenho do processo ao longo do tempo.

A carta de controlo tipo Shewhart é uma representação gráfica de valores de uma estatística e contém uma linha central que representa o valor médio da característica de qualidade e, duas linhas simetricamente colocadas acima e abaixo da linha central, que são designadas por limites de controlo. Se designarmos por Q uma estatística amostral que mede uma determinada característica de qualidade, com média μ_Q e desvio padrão σ_Q , a carta ficará definida com uma linha central igual a μ_Q , um limite superior de controlo (LSC) igual a $\mu_Q + L\sigma_Q$ e um limite inferior de controlo (LIC) igual a $\mu_Q - L\sigma_Q$. O coeficiente L representa a distância dos limites de controlo à linha central, medida em unidades do desvio padrão da estatística e usualmente, assume-se que $L=3$, sendo os limites conhecidos por limites “3-sigma”. Assim, através da representação da linha central (μ_Q) obtém-se a percepção da tendência dos valores em relação ao valor real ou esperado, e as linhas LIC e LSC, representam os limites que prevêem 99.7% de incidência dos resultados (Pereira, 2006).

Efectuando a subdivisão do espaço compreendido entre as duas linhas LIC e LSC, em função do desvio padrão (SD, 2SD e 3SD), obtêm-se seis regiões dispostas simetricamente à linha central. A região de alerta fica situada entre 2SD e 3SD, a zona intermédia entre 1SD e 2SD, e a zona central assume valores compreendidos entre a média dos valores e 1SD. Se a carta de controlo estiver estatisticamente bem estabelecida, estima-se que 99.7% dos valores experimentais incidam dentro dos limites estabelecidos pelas suas linhas de acção, caso contrário, corresponde a uma situação anómala (Pereira, 2006).

Foram feitas cartas de controlo de Shewhart para cada esterol, utilizando amostras LA controlo, sobrecarregadas com uma mistura padrão de 7-DHC, latosterol, desmosterol e β -sitosterol com concentração de 1 μ M, extraídas durante os ensaios para a validação do método e quantificação de esteróis nos LA. Estas cartas controlo permitem verificar a estabilidade dos padrões adicionados à amostra LA controlo com o passar do tempo e, a variação de concentração de cada esterol na amostra, em função dos vários ensaios realizados em dias diferentes.

Tabela 3.6. Tabela com os valores de concentração obtidos para cada esterol em cada amostra LA controlo, utilizados nas cartas de controlo.

Tempo (dias)	Concentração (μ M)				
	Colesterol	Desmosterol	7-DHC	Latosterol	β -Sitosterol
1.º	34.381	1.107	1.002	1.000	0.975
2.º	35.226	1.143	1.004	0.985	0.996
3.º	33.792	1.182	0.999	1.042	1.094
4.º	35.256	1.130	1.012	0.993	0.999
5.º	34.426	1.109	1.001	0.991	1.008
6.º	33.082	1.117	1.002	1.104	1.064
7.º	34.040	1.194	1.044	1.100	0.997
8.º	34.875	1.097	0.929	1.021	0.988
9.º	33.613	1.050	1.054	1.112	1.127
10.º	34.316	1.196	0.975	0.998	0.996
11.º	33.190	1.131	0.982	1.100	1.022
12.º	33.473	1.054	0.999	0.990	1.104
13.º	32.401	1.109	0.978	1.051	1.088
14.º	34.008	1.112	1.065	1.070	1.080
15.º	34.988	1.108	1.015	1.050	1.002
16.º	31.801	1.143	0.904	1.099	1.068
17.º	33.375	1.198	0.946	0.994	1.031
18.º	34.045	1.122	0.970	1.064	1.121
19.º	32.126	1.198	0.903	1.040	1.129
20.º	33.089	1.199	0.995	0.998	1.016
21.º	34.686	1.126	0.995	1.085	1.063
22.º	32.643	1.117	1.004	1.070	1.040
23.º	35.412	1.216	0.970	1.059	1.047
24.º	33.294	1.207	0.903	1.037	1.058

25.º	34.618	1.211	0.968	1.029	1.049
26.º	33.639	1.106	1.023	1.169	1.092
27.º	34.643	1.042	1.004	1.085	1.022
28.º	35.801	1.100	0.979	1.026	1.055
29.º	36.264	1.128	1.025	1.105	1.138
30.º	32.860	1.200	1.057	1.058	1.063
Média	33.979	1.138	0.990	1.051	1.051
Desvio Padrão	1.094	0.050	0.042	0.047	0.047

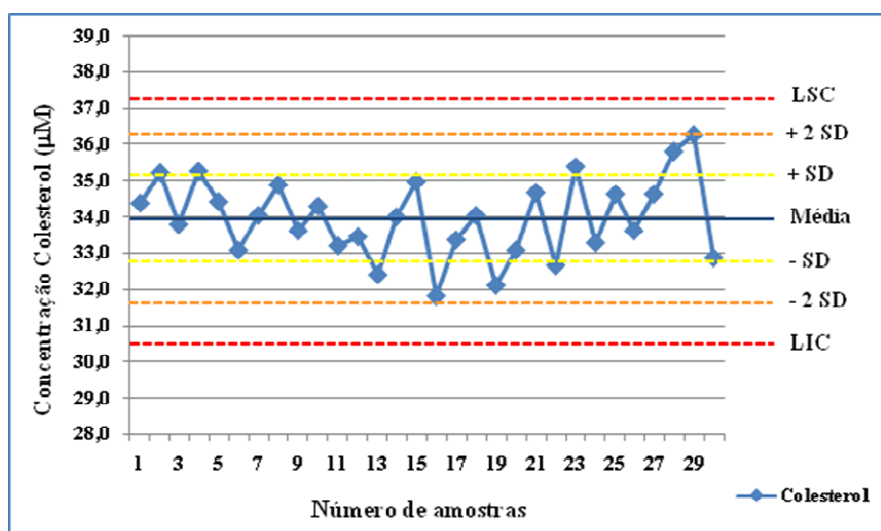


Figura 3.15. Carta de controlo para o colesterol. Legenda: LIC – limite inferior de controlo; LSC – limite superior de controlo.

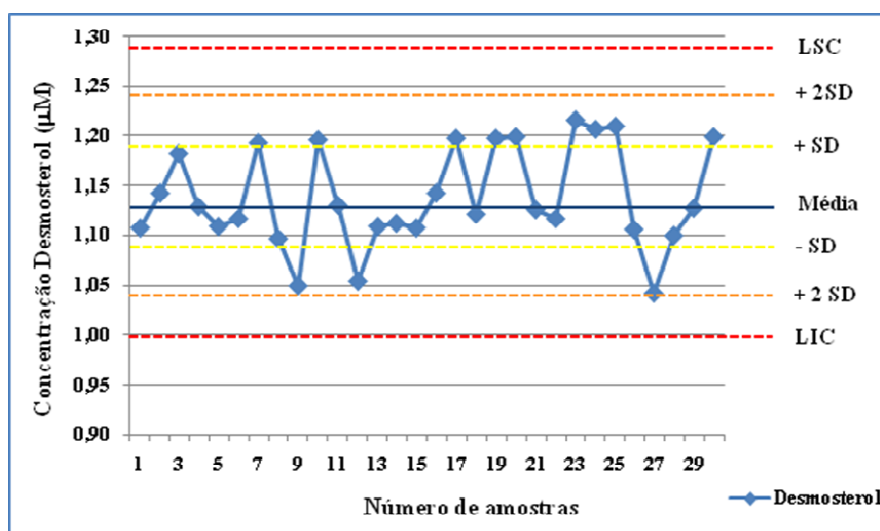


Figura 3.16. Carta de controlo para o desmosterol. Legenda: LIC – limite inferior de controlo; LSC – limite superior de controlo.

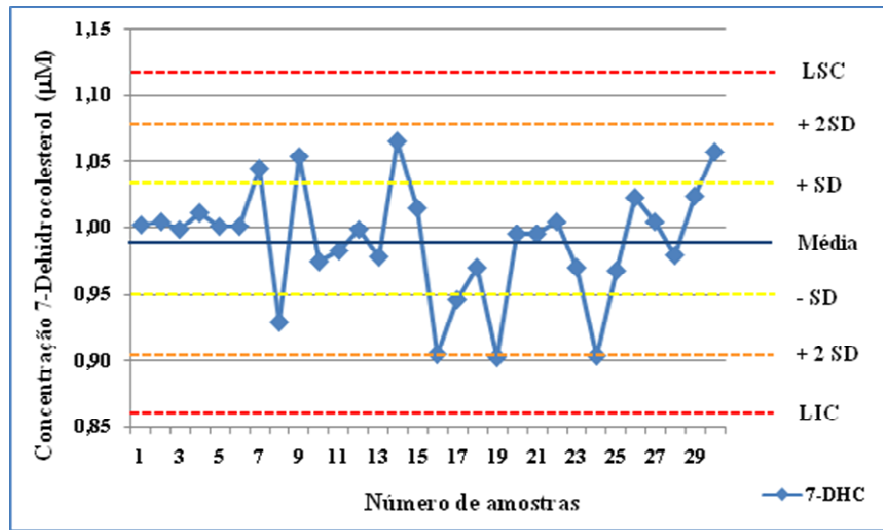


Figura 3.17. Carta de controlo para o 7-dehidrocolesterol. Legenda: LIC – limite inferior de controlo; LSC – limite superior de controlo.

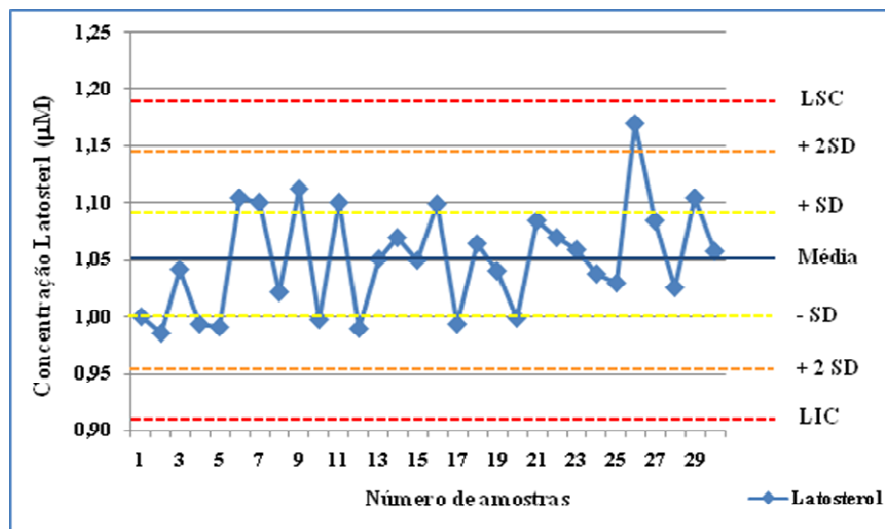


Figura 3.18. Carta de controlo para o latosterol. Legenda: LIC – limite inferior de controlo; LSC – limite superior de controlo.

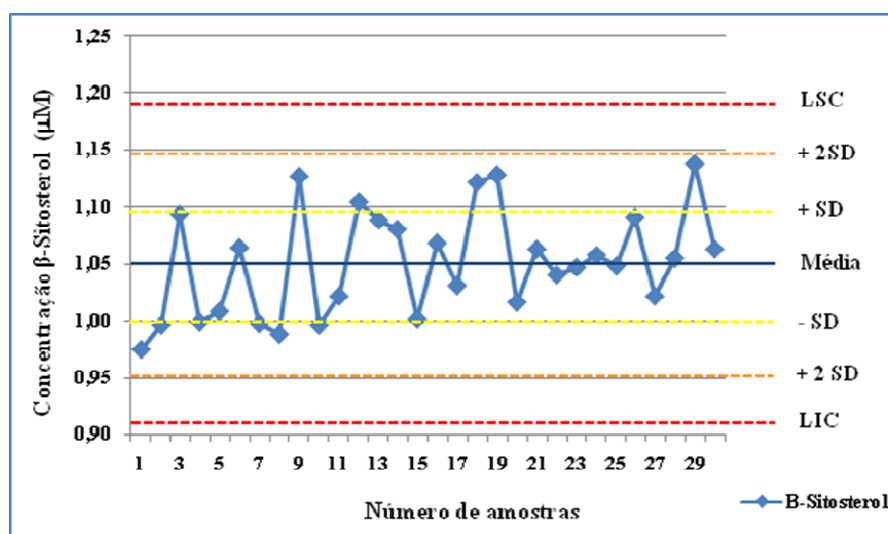


Figura 3.19. Carta de controlo para o β -sitosterol. Legenda: LIC – limite inferior de controlo; LSC – limite superior de controlo.

Pela norma ISO 8258:1991 (Pereira, 2006), foram estabelecidas algumas regras para a interpretação das cartas de controlo e para a detecção de anomalias (arranjos e sequências de valores pouco vulgares em relação ao comportamento esperado para uma variável aleatória com distribuição normal). De acordo com esta norma, são reconhecidas como situações de não conformidade os seguintes casos:

1. Atingir um valor fora das linhas de controlo (LIC e LSC);
2. Obter dois ou mais valores sucessivos na mesma zona de alerta (entre 2SD e 3SD);
3. Numa sucessão de cinco valores, quatro destes caírem na zona intermédia (entre 1SD e 2SD);
4. Sucessão de seis valores com a mesma tendência, crescente ou decrescente;
5. Numa sucessão de oito valores consecutivos todos caírem na zona intermédia sem que nenhum destes pertença à região central;
6. Sucessão de nove valores apenas numa das zonas centrais;
7. Sucessão de catorze valores em ziguezague;
8. Sucessão de quinze valores em ambas faixas centrais.

Para o colesterol, desmosterol, 7-DHC e β -sitosterol as cartas de controlo apresentam valores compreendidos entre $-2SD$ e $+2SD$, no caso do latosterol, apenas um valor ultrapassa a zona intermédia e incide na zona de alerta.

Por análise das cartas de controlo de cada esterol e tendo em conta as normas ISO 8258:1991, verifica-se que para cada esterol nenhuma das regras foi quebrada, o que indica que para uma variável aleatória, os seus valores seguem uma distribuição normal não havendo a ocorrência de situações anómalas.

3.4.5.5. Taxa de recuperação

Para além da repetibilidade e reprodutibilidade do método, foi também determinada a taxa de recuperação do método, através de ensaios com a amostra controlo LA, à qual são adicionados padrões de esteróis com concentrações conhecidas. A metodologia para a determinação da taxa de recuperação foi adaptada de Ahmida *et al.* (2006).

A taxa de recuperação é determinada por análise em triplicado de uma amostra LA controlo, com a adição de padrões de esteróis de duas concentrações diferentes, em 2 ensaios distintos. No primeiro ensaio a amostra LA controlo foi sobrecarregada com uma mistura padrão de 7-DHC, latosterol, desmosterol e β -sitosterol de concentração $1\mu\text{M}$ e com uma solução padrão de colesterol de concentração $10\mu\text{M}$. No segundo ensaio a amostra LA controlo foi sobrecarregada com uma mistura padrão de 7-DHC, latosterol, desmosterol e β -sitosterol de concentração $5\mu\text{M}$ e com uma solução padrão de colesterol de concentração $5\mu\text{M}$.

A fórmula empírica para determinar a taxa de recuperação (%) é:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(\text{Quantidade de amostra encontrada} - X_0)}{\text{Quantidade de amostra adicionada}} \times 100$$

X_0 – Quantidade inicial na amostra.

Para além da determinação da taxa de recuperação é também determinado o coeficiente de variação (%).

Os resultados obtidos são apresentados na tabela 3.7.

Tabela 3.7. Tabela com as concentrações obtidas para cada esterol em cada ensaio e para cada amostra, e respectivas taxas de recuperação (%) e coeficientes de variação (%).

Ensaio	Composto	Variáveis Determinadas	Amostras			Estatística			
			A1	A2	A3	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)	
1	Colesterol	Concentração	45.304	45.396	44.984	45.228	0.216	0.5	
		Taxa recuperação	96.2	97.1	93.0	95.4	2.2	2.2	
	Desmosterol	Concentração	1.151	1.129	1.173	1.151	0.022	1.9	
		Taxa recuperação	94.3	92.1	96.5	94.3	2.2	2.3	
	7-DHC	Concentração	0.963	0.979	0.957	0.966	0.012	1.2	
		Taxa recuperação	95.8	97.4	95.1	96.1	1.2	1.2	
	Latosterol	Concentração	1.045	1.030	1.058	1.044	0.014	1.4	
		Taxa recuperação	97.7	96.1	98.9	97.6	1.4	1.5	
	β-Sitosterol	Concentração	1.048	1.032	1.029	1.036	0.010	1.0	
		Taxa recuperação	98.9	97.3	97.0	97.7	1.1	1.1	
	2	Colesterol	Concentração	40.384	40.587	40.425	40.465	0.107	0.3
			Taxa recuperação	93.9	97.9	94.8	95.6	2.1	2.2
Desmosterol		Concentração	5.105	5.139	5.118	5.121	0.018	0.3	
		Taxa recuperação	97.9	98.6	98.2	98.2	0.4	0.4	
7-DHC		Concentração	4.885	4.908	4.844	4.879	0.033	0.7	
		Taxa recuperação	97.6	98.1	96.8	97.5	0.7	0.7	
Latosterol		Concentração	5.023	5.016	5.009	5.016	0.007	0.1	
		Taxa recuperação	99.1	98.9	98.8	99.0	0.1	0.1	
β-Sitosterol		Concentração	5.021	5.017	5.010	5.016	0.006	0.1	
		Taxa recuperação	99.2	99.2	99.0	99.1	0.1	0.1	

Legenda: A – amostra; 7-DHC – 7-deidrocolesterol.

Nota 1: As taxas de recuperação são dadas em % e as concentrações em μM .

Nota 2: No 1.º ensaio a amostra LA controlo foi sobrecarregada com uma mistura padrão de 7-DHC, latosterol, desmosterol e β -sitosterol de concentração $1\mu\text{M}$ e com uma solução padrão de colesterol de concentração $10\mu\text{M}$. No 2.º ensaio a amostra foi sobrecarregada com uma mistura padrão de 7-DHC, latosterol, desmosterol e β -sitosterol e com uma solução padrão de colesterol, ambas de concentração $5\mu\text{M}$.

Nota 3: A concentração inicial (X_0) de cada esterol na amostra LA sem sobrecarga dos padrões é: 35.69 μ M para o colesterol, 0.21 μ M para o desmosterol, 0.0053 μ M para o 7-DHC, 0.068 μ M para o latosterol e 0.059 μ M para o β -sitosterol.

Nota 4: Em amarelo claro, estão representadas as taxas de recuperação de cada esterol e para cada amostra extraída em ambos os ensaios. Em amarelo escuro, estão representadas as médias das taxas de recuperação para cada esterol, determinadas pela extração em triplicado das amostras, em cada ensaio. Em rosa, estão representadas as médias dos coeficientes de variação das taxas de recuperação para cada esterol, determinadas pela extração em triplicado das amostras, em cada ensaio.

Como se verifica pela tabela 3.6., a média das taxas de recuperação (na tabela em amarelo escuro) para cada esterol e em cada ensaio, são superiores a 90% e próximas de 100%, pelo que este método mostrou ter uma boa taxa de recuperação para todos os esteróis. Esta observação é corroborada pelos coeficientes de variação (na tabela em rosa) para cada esterol e para cada ensaio, uma vez que estes são inferiores a 5%, próximos e até mesmo inferiores a 1% (que é o caso do desmosterol, 7-DHC, latosterol e β -sitosterol no segundo ensaio).

3.4.5.6. Limite inferior de detecção e limite inferior de quantificação

Utilizando o método de GC-MS otimizado, determinou-se o limite inferior de detecção (LID) e o limite inferior de quantificação (LIQ), através da razão S/R. Para a determinação destes valores fizeram-se vários ensaios com soluções padrão dos diferentes esteróis, com baixas concentrações e ensaios com amostras de LA controlo.

Os valores de LID foram determinados quando a razão S/R = 3 e os valores de LIQ quando a razão S/R = 10.

Os valores de LID e LIQ em nM, para cada esterol, são apresentados na tabela 3.8.

Tabela 3.8. Tabela com os limites inferiores de detecção (LID) e quantificação (LIQ) em nM para cada esterol.

Composto	LID (nmol/L)	LIQ (nmol/L)
Colesterol	10	50
Desmosterol	5	10
7-DHC	0.8	1
Latosterol	1	5
β-sitosterol	1	5

Legenda: 7-DHC – 7-dehidrocolesterol.

3.4.6. Tratamento Estatístico

Os resultados foram analisados e tratados estatisticamente recorrendo-se ao programa de tratamento de dados estatísticos *Statistical Package for Social Sciences - SPSS®* (versão 14.0 para Windows).

Numa primeira fase, determinaram-se os parâmetros estatísticos (média, mediana, desvio padrão, variância, coeficiente de variação (%), mínimo, máximo, intervalo interquartil, percentis (25, 50 e 75%), curtose e assimetria) de cada esterol para cada semana de gestação e avaliaram-se as diferentes distribuições (semana de gestação versus concentração de esterol) (através da Correlação de Pearson), averiguando se os dados se distribuíam de modo normal (através dos testes de hipóteses Kolmonov-Smirnov e Shapiro-Wilk). Como a distribuição não era normal, era assimétrica, recorreu-se a testes não paramétricos para comparar as diferentes categorias e averiguar as significâncias (Teste para N variáveis independentes e contínuas - Teste das Medianas).